Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۵، شمـاره‌ی ۱۱۱، مهـر و آبان ۱۳۹۶، صفحات ۴۱ تا ۵۶

تأثیر آنتی-آپوپتوتیک سلژلین به‌عنوان بازدارنده‌ی مونو آمین اکسیداز بر سلول‌های بنیادی عصبی مشتق شده از هیپوکمپ موش صحرایی در شرایط آسیب اکسیداتیو

علی نیک‌فر[۱]، دکتر علیرضا عبدانی‌پور[۲]، معصومه قلی‌نژاد[۳]

نویسنده‌ی مسئول: گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان abdani.anatomy@yahoo.com

دریافت: ۹۵/۵/۱۹ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: *در سیستم عصبی، سلول‌های آسیب دیده و التهابی گونه‌های اکسیژن فعال را تولید می‌کنند. تولید بیش از حد گونـه‌هـای اکـسیژن فعال می‌تواند به بیومولکول‌های مهم در بدن آسیب‌های جدی وارد نموده، مرگ برنامه‌ریزی شده را بیش از حد فعال نماید و در نهایت منجر بـه بروز بیماری‌های تحلیل برنده‌ی عصبی شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر مهاری سلژلین بر روی آپوپتوز در سلول‌های بنیادی عصبی مـشتق از هیپوکمپ موش صحرایی در معرض آسیب اکسیداتیو ناشی از هیدروژن پراکساید بود.*

روش بررسی: *سلول‌های بنیادی عصبی از هیپوکمپ نوزاد موش صحرایی جداسازی شدند. سپس با غلظت‌هـای مختلـف سـلژلین بـرای مـدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و به دنبال آن به مدت ۳۰ دقیقه در معرض هیدروژن پراکساید ۱۲۵ میکرومولار قرار گرفتند. با روش MTT و رنگ‌آمیزی تانل، تاثیر محافظتی سلژلین بر بقای سلول‌ها و میزان آپوپتوز نسبت به‌گروه کنترل بدون دریافت سـلژلین مـورد ارزیـابی قـرار گرفـت. همچنـین به‌منظور بررسی تمایز سلول‌های بنیادی عصبی به سلول‌های شبه‌عصبی از رنگ‌آمیزی نیسل استفاده گردید.*

یافته‌ها: *نتایج حاصل نشان داد که میزان آپوپتوز در غلظت 10^{-7}مولار سلژلین به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنتـرل کـاهش داشـت. همچنـین درصد سلول‌های نیسل مثبت در گروه تیمار شده نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد.*

نتیجه‌گیری: *یافته‌های ما نشان داد که داروی سلژلین از سلول‌های بنیادی عصبی در برابر مرگ ناشی از آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند و بنـابر این ممکن است میزان بقای سلول‌ها را افزایش دهد که می‌تواند کاندید مناسبی جهت درمان بیماری‌های عصبی مرتبط با استرس اکسیداتیو باشد.*

واژگان کلیدی: سلول بنیادی عصبی، سلژلین، آسیب اکسیداتیو، آپوپتوز

مقدمه

افزایش سطح بهداشت و پیـشرفت‌هـای سیـستم پزشـکی منجر به افزایش سطح سلامت و بـالا رفـتن میـانگین سـن در جوامع شده است. در نتیجه افراد مسن، بخش قابل تـوجهی از جوامع امروز را به خود اختصاص می‌دهند. همین امر موجـب شده که از عصر حاضر به عنوان عصر پیری نام برده شـود. بـا بـالا رفـتن سـن، بـروز برخـی از بیمـاری‌هـا مثـل سـرطان، بیماری‌های قلبی و عروقی و بیماری‌های تحلیل برنده عـصبی نیز افزایش می‌یابـد (۱). بیمـاری‌هـای تحلیـل برنـده عـصبی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، گروه ژنتیک و پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

۲- دکترای علوم تشریح، استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، گروه بیوتکنولوژی و نانوفناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

(Neurodegenerative Diseases)، اختلالات نورولوژیک و پیشرونده‌ای هستند که منجر به ایجاد ضایعات عصبی غیر قابل برگشت می‌شوند. مرگ سلول‌های عصبی در بخش‌های مختلف سیستم عصبی، منجر به ایجاد طیف متنوعی از بیماری‌ها مثل آلزایمر، پارکینسون، هانتینگتون، آمیوتروفیک لاترال اسکلروزیس، مولتیپل اسکلروزیس و غیره می‌شود. در جهان بیش از ۳۰ میلیون نفر مبتلا به انواع مختلف بیماری‌های تحلیل برنده‌ی عصبی می‌باشند. در حال حاضر، درمان قطعی برای بیشتر بیماری‌های تحلیل برنده ی عصبی وجود ندارد. با این وجود تجویز برخی داروها در کاهش علائم این بیماری‌ها موثر می‌باشد (۲).

یکی از عوامل عمده در بروز بیماری‌های تحلیل برنده عصبی، آسیب اکسیداتیو می‌باشد که به دلیل افزایش تولید اکسیدان‌های سلولی و یا نقص در مکانیسم‌های حفاظتی در برابر اکسیدان‌ها رخ می‌دهد. نقش آسیب اکسیداتیو علاوه بر بیماری‌های تحلیل برنده عصبی، در ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌های دیگر همچون دیابت ملیتوس، بیماری‌های قلبی و عروقی، آرتریت روماتوئید و سرطان‌های مختلف نیز به خوبی شناخته شده است (۳). در بیماری‌های تحلیل برنده‌ی عصبی، استرس اکسیداتیو ابتدا در محل‌های محدودی از قبیل کورتکس مغز مبتلایان به آلزایمر، synculin در ساقه مغز بیماران پارکینسون و کانال کلسیمی گیرنده گلوتامات در سیستم طناب نخاعی بیماران مبتلا به ALS رخ می‌دهد (۴). در چنین بیماری‌هایی تخریب نورون‌ها توسط عوامل مختلفی همچون آسیب اکسیداتیو، عدم عملکرد پروتئین‌های حیاتی و فاکتورهای ژنتیکی اتفاق می‌افتد. افزایش استرس اکسیداتیو در نهایت باعث آپوپتوز در سلول‌های عصبی می‌شود. از همین رو مهار و تداخل در روند آپوپتوز در سلول‌های عصبی می‌تواند به‌عنوان رویکردی جهت درمان این بیماری‌ها باشد (۵). سلول‌های بنیادی عصبی (NSC) زیرمجموعه‌ای از سلول‌های سیستم عصبی بوده و به‌عنوان سلول‌هایی چندتوان و با قدرت خودنوسازی، توانایی تمایز به اکثر سلول‌های تخصص‌یافته مغزی را دارند. این سلول‌ها در دوران جنینی منجر به تشکیل و تکامل سیستم عصبی می‌گردند، اما در بالغین در پاسخ به عوامل پاتولوژیک مختلف نظیر تروما، ایسکمی، التهاب و تحلیل نورونی فعال شده و با القای تقسیم، مهاجرت و تمایز سلول‌ها در راستای ترمیم ضایعات و بهبود بیماری‌های سیستم عصبی شرکت می‌کنند (۶).

سلژلین (دپرنیل) نوعی ترکیب شیمیایی با فرمول $C_{13}H_{17}N$ می‌باشد که باعث کاهش هیدروژن پراکساید، افزایش بیان آنتی‌اکسیدان‌ها و در نهایت کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود. این دارو برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ میلادی توسط پروفسور نول ساخته شد (۷). سلژلین در ابتدا به دلیل اثراتش روی سیستم عصبی به‌عنوان داروی ضد افسردگی معرفی گردید اما بعدها مشخص شد که این ترکیب به صورت انتخابی و برگشت ناپذیر، آنزیم مونوآمین اکسیداز B (MAO-B) را مهار می‌کند. مونوآمین اکسیدازهای A و B آنزیم‌های اصلی در اکسیداسیون نوروترانسمیترهایی مانند دوپامین، نورآدرنالین و سروتونین در سیستم عصبی مرکزی و محیطی می‌باشند و به‌همین دلیل سلژلین سبب افزایش میانجی دوپامین می‌شود. این امر موجب شده که سلژلین در جهت درمان بیماری پارکینسون و آلزایمر مورد استفاده قرار بگیرد (۸).

روش بررسی

این مطالعه‌ی تجربی، با کد ZUMS.REC.1394.120 به تصویب کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی زنجان رسید و تمامی مراحل با رعایت اصول و مقررات آیین‌نامه کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب در دانشگاه انجام پذیرفت.

جداسازی سلول‌های بنیادی عصبی: برای جداسازی سلول‌های بنیادی عصبی از نوزاد ۲ تا ۳ روزه موش صحرایی نژاد ویستار استفاده گردید. نوزاد موش با استفاده از کلروفرم بیهوش و سپس کشته شد. پس از باز کردن جمجمه در

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

شرایط کاملا استریل، مغز نوزاد برداشته و به پتری‌دیش حاوی فسفات بافر سالین (Sigma) و آنتی‌بیوتیک پنی سیلین G انتقال یافت. به‌منظور پرهیز از آلودگی‌های احتمالی بافت مغز به زیر هود استریل کشت سلول منتقل و قسمت هیپوکمپ جدا شد. بافت هیپوکمپ تا حد امکان به وسیله‌ی تیغ جراحی به قطعات کوچک‌تر تبدیل و به منظور هضم آنزیمی به لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری استریل حاوی نسبت‌های برابر از آنزیم‌های کلاژناز (Sigma) و اکیوتاز (Sigma) منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه تکان‌دهنده‌ی اتوماتیک و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس خنثی‌سازی آنزیم‌های مذکور با استفاده از سرم FBS انجام شد. در مرحله‌ی بعد سوسپانسیون سلولی شیری رنگ از فیلتر مش نایلونی ۷۰ میکرومتری (Biofil) عبور داده شد تا قطعات بزرگ بافتی هضم نشده حذف شوند. سپس مایع فیلتر شده به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰g و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ، مایع رویی تخلیه و رسوب سلولی به دست آمده با محیط کشت DMEM/F12 حاوی فاکتورهای رشد bFGF (Millipore)، EGF (Sigma)، B27 (Gibco)، پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۱ درصد و همچنین ۳ درصد سرم FBS در پلیت غیرچسبنده کشت داده شد.

تشکیل نوروسفر: عدم اتصال سلول‌های بنیادی عصبی به بستر پلیت غیرچسبنده منجر به معلق ماندن این سلول‌ها در محیط کشت شده و تکثیر این سلول‌ها در این شرایط منجر به ایجاد توده‌های سلولی متراکم و شناور به نام نوروسفر شدند که به مرور زمان و با تکثیر بیشتر سلول‌ها، اندازه‌ی نوروسفرها نیز افزایش یافت. به‌منظور تشکیل نوروسفر، سلول‌های جدا شده از هیپوکمپ به‌مدت ۱ هفته درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و CO2 ۵ درصد قرار گرفتند. جهت در دسترس بودن محیط کشت تازه برای سلول‌ها، هر دو روز مقدار معینی محیط کشت جدید به محیط کشت قدیمی اضافه گردید (۹).

شکست نوروسفرها: نوروسفرهای ایجاد شده پس از یک هفته جمع‌آوری و به فالکون استریل منتقل و به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰g و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ گردیدند. سپس محیط رویی تخلیه و توده‌های سلولی با استفاده از آنزیم تریپسین از هم جدا شده و به صورت سلول‌های منفرد درآمدند. در ادامه پس از خنثی‌سازی آنزیم تریپسین با FBS و سانتریفوژ مجدد، سلول‌های حاصله به فلاسک سلولی پوشانده شده از پلی-ال-لیزین منتقل و با استفاده از محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد و در شرایطی مشابه با مرحله تشکیل نوروسفر، کشت داده شدند (۱۰).

ایمنوسیتوشیمی: نشانگر اختصاصی سلول‌های بنیادی عصبی، نستین می‌باشد. به‌همین دلیل برای اطمینان از ماهیت سلول‌های کشت شده، وجود نشانگر اختصاصی نستین در سلول‌های کشت داده شده با استفاده از روش ایمنوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت. بدین‌منظور، از سلول‌های پاساژ چهارم با تراکم ۷۰ درصد استفاده گردید، به‌طوری که پس از شستشو با PBS سلول‌ها توسط پارافرمالدهید ۴ درصد به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند. برای رنگ‌آمیزی عناصر سیتوپلاسمی، سلول‌ها برای مدت ۳۰ دقیقه در معرض تریتون ۰/۳ درصد نیز قرار گرفتند تا از هم پاشیدگی غشای سلولی منجر به افزایش نفوذ آنتی‌بادی‌ها به داخل سلول‌ها گردد. در مرحله‌ی بعد، با اضافه کردن سرم جنینی گوساله ۱۰ درصد از واکنش‌های غیراختصاصی جلوگیری شد. سپس سلول‌ها به مدت ۱۲ ساعت و در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد در معرض آنتی بادی اولیه Mouse Anti- Nestin, Monoclonal Antibody قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان، سلول‌ها ۳ مرتبه با PBS شستشو و در ادامه به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و همچنین محیط تاریک در معرض آنتی‌بادی ثانویه ضد موشی کونژوگه با FITC با غلظت ۱/۱۰۰ قرار گرفتند. به‌منظور مشخص شدن هسته سلول‌ها در

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

هنگام شمارش، از محلول اتیدیوم بروماید ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌مدت یک دقیقه استفاده گردید. در نهایت سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت اینورت مورد بررسی قرار گرفتند. از هر چاهک، تعداد پنج ناحیه به‌طور تصادفی انتخاب و درصد سلول‌های مثبت ارزیابی گردید.

آزمون MTT: به منظور تعیین دوز بهینه‌ی سلژلین، سلول‌های بنیادی عصبی با غلظت‌های مختلفی از داروی سلژلین تیمار شدند و سپس درصد سلول‌های زنده به روش MTT assay ارزیابی شد. سلول‌های بنیادی عصبی، طی پاساژ سلولی از فلاسک سلولی جدا شده و تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. درصد سلول‌های زنده در غلظت‌های 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5}، 10^{-6}، 10^{-7}، 10^{-8} و 10^{-9} مولار از سلژلین مورد بررسی قرار گرفت. از سلول‌های بنیادی عصبی بدون دریافت سلژلین نیز به‌عنوان نمونه کنترل استفاده گردید. پس از ۴۸ ساعت تیمار با سلژلین، سلول‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در معرض هیدروژن پراکساید ۱۲۵ میکرومولار قرار گرفتند (۱۲و ۱۱). سپس هیدروژن پراکساید از چاهک‌ها تخلیه و شستشو با PBS انجام پذیرفت. در مرحله‌ی بعد به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (۱ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر) اضافه و به مدت ۴ ساعت در محیط تاریک و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس محیط کشت چاهک‌ها به آرامی تخلیه و با ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO جایگزین شد تا کریستال‌های فورمازان در اثر واکنش با MTT به حالت محلول درآیند. در نهایت جذب نوری محلول با استفاده از دستگاه الایزا و در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت و به کمک منحنی استاندارد درصد سلول‌های زنده محاسبه گردید. برای بررسی دقیق‌تر، آزمون هر غلظت ۵ بار تکرار گردید.

رنگ‌آمیزی کرزیل فست ویوله: جهت بررسی اجسام نیسل از رنگ‌آمیزی کرزیل فست ویوله (رنگ‌آمیزی نیسل) استفاده شد. تغییر سلول‌های بنیادی عصبی به سلول‌های شبه عصبی را می‌توان با رنگ‌آمیزی کرزیل فست ویوله مورد بررسی قرار داد. سلول‌های مورد بررسی شامل سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با غلظت بهینه سلژلین و سلول‌های بنیادی عصبی تیمار نشده بودند. بدین منظور سلول‌های پاساژ چهارم در پلیت ٦ خانه کشت داده شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم مورد نظر، محیط کشت سلول‌ها تخلیه و ۳ مرتبه شستشو با PBS انجام گردید. تثبیت سلول‌ها با استفاده از پارافرمالدهید ٤ درصد و انکوباسیون در دمای اتاق به‌مدت ۱ ساعت انجام پذیرفت. جهت رنگ‌آمیزی، سلول‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در معرض محلول کرزیل فست ویوله قرار گرفتند. سپس محلول رنگی خارج و مجددا با PBS شستشو داده شد تا باقیمانده رنگ از محیط حذف گردد. در نهایت اجسام نیسل به‌وسیله میکروسکوپ اینورت مورد مطالعه قرار گرفت و درصد سلول‌های مثبت محاسبه گردید.

آزمون تانل: جهت بررسی میزان آپوپتوز در سلول‌های بنیادی عصبی از روش TUNEL assay استفاده شد. بدین منظور سلول‌های بنیادی عصبی در پلیت ٤٨ خانه کشت داده شدند. پس از ٤٨ ساعت تیمار با دوز بهینه سلژلین، سلول‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در معرض هیدروژن پراکساید ۱۲۵ میکرومولار قرار گرفتند تا القای آپوپتوز انجام شود. پس از تخلیه ی هیدروژن پراکساید و شستشو با PBS، سلول‌ها توسط پارافرمالدهید ٤ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند. سپس سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در معرض محلول Blocking (۳ H_2O_2 درصد در متانول) قرار گرفتند. به‌منظور افزایش نفوذپذیری سلول‌ها از محلول Permeabilisation (تریتون ۰/۱ درصد در سرم ۱۰ درصد) استفاده شد. سلول‌ها مطابق با دستورالعمل کیت In-Situ Cell Death Detection (Roche)، به مدت ۱ ساعت تحت تیمار با محلول Reaction mixture در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و محیط مرطوب قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعد مقدار ۵۰ میکرولیتر محلول Converter-POD اضافه و مجددا به

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس سلول‌های تانل مثبت توسط ماده‌ی رنگزای دی آمینو بنزیدین (DAB) رنگ‌آمیزی شدند. به‌منظور تسهیل در بررسی، سلول‌ها توسط هماتوکسیلین نیز رنگ‌آمیزی گردیدند. در نهایت از هر چاهک ۵ ناحیه به صورت تصادفی انتخاب و درصد سلول‌های مثبت محاسبه گردید (۱۳).

تجزیه و تحلیل آماری: تمامی آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS۱۵ انجام پذیرفت و کلیه‌ی داده‌ها به‌صورت Mean ±SEM ارائه شد. مقایسه‌ی آماری بین گروه‌ها با استفاده از آزمون Anova (آزمون تعقیبی Tukeys post hoc test) و آزمون تی تست مستقل تجزیه و تحلیل و P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج کشت سلول‌های بنیادی عصبی: سلول‌های استخراج شده با قرار گرفتن در پلیت غیر چسبنده و محیط کشت القایی مناسب به‌صورت شناور در محیط درآمدند. این سلول‌های منفرد با گذر زمان به مرور در کنار هم قرار گرفتند. به‌طوری که پس از یک ساعت منجر به ایجاد کلونی‌های کوچک، نامنظم و شناور در محیط به نام نوروسفر شدند. اندازه‌گیری قطر نوروسفرها در زمان‌های ۳ ساعت، ۱ روز، ٤ روز و ۷ روز پس از کشت، نشان داد که کلونی‌های کوچک به مرور با هم متحد شده و کلونی‌های بزرگتر را تشکیل می‌دهند. تکثیر سلول‌ها نیز عامل دیگری بر افزایش اندازه‌ی نوروسفرها بود. این نتایج نشان دادند که قطر نوروسفرها در روز هفتم (۲۷۷/۷±۱۲/۱ میکرومتر) به‌طور معناداری نسبت به نوروسفرهای ۳ ساعت (۳۰/۶±۱/۷ میکرومتر)، ۱ روز (۷۸/۲±۱/۳ میکرومتر) و ٤ روز (۱۱۷/۷±۳/۴ میکرومتر) افزایش داشت (شکل۱). پس از شکست نوروسفرها بعد از ۷ روز و کشت آنها در فلاسک، سلول‌های بنیادی عصبی به کف فلاسک چسبیده و زائده‌هایی در آنها ایجاد گردید که گاهی چند برابر جسم سلولی و در ارتباط با سلول‌های اطراف بودند. سلول‌ها دارای قدرت تقسیم بودند و از نظر مورفولوژی، ویژگی‌های سلول شبه عصبی را به دست آوردند. سلول‌های بنیادی عصبی پس از یک هفته فلاسک سلولی را به‌طور کامل پر کرده و نمایی کشیده و دوکی شکل با زوائد سیتوپلاسمی به خود گرفتند.

تایید ماهیت سلول‌های بنیادی عصبی با نشانگر نستین به‌روش ایمنوسیتوشیمی: استفاده از روش ایمنوسیتوشیمی جهت بررسی نشانگر نستین به‌منظور اثبات ماهیت سلول‌های بنیادی عصبی، نشان داد که ۱۰۰ درصد سلول‌های کشت داده شده دارای این نشانگر اختصاصی می‌باشند. به طوری که سیتوپلاسم سلول‌های نستین مثبت به دلیل استفاده از آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با FITC به رنگ سبز و هسته سلول‌ها توسط اتیدیوم بروماید به رنگ قرمز مشاهده شدند (شکل ۲A). لازم به ذکر است برای بررسی این نشانگر اختصاصی از سلول‌های بنیادی عصبی پاساژ چهارم با تراکم ۷۰ درصد استفاده شد (شکل ۲C). بدین ترتیب صحت سلول‌های استخراج و کشت شده تایید گردید.

تعیین غلظت بهینه سلژلین به روش MTT: به منظور بررسی اثر حفاظتی سلژلین، سلول‌های بنیادی عصبی پس از تیمار با غلظت‌های مختلف سلژلین در معرض هیدروژن پراکساید قرار گرفتند. بررسی‌های انجام شده نشان داد که سلژلین منجر به حفاظت از سلول‌های بنیادی عصبی در برابر سمیت ناشی از هیدروژن پراکساید و افزایش بقای سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با سلژلین در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. سلول‌های تیمار شده با غلظت 10^{-7} M از سلژلین (۹۱/۳۲±۳/۰۹) بالاترین درصد سلول‌های زنده را داشتند که نسبت به سلول‌های تیمار شده با غلظت 10^{-3} (۸۵/۹±۰/۲) مولار، 10^{-8} (۷۳/۵۸±۱/۸۹) مولار و 10^{-9} (۷۹/۴۲±۱/۹۹) مولار اختلاف معنی‌داری داشتند، اما با سایر گروه‌ها اختلاف معناداری مشاهده نشد (P<۰/۰۵). درصد سلول‌های زنده،

www.SID.ir

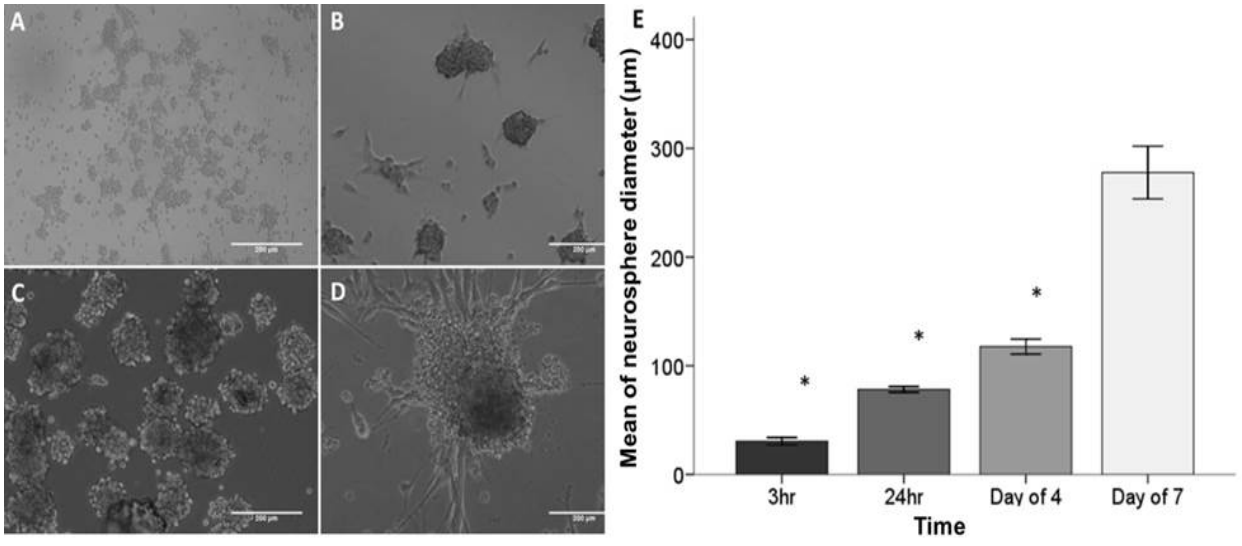
Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

وابسته به غلظت سلژلین در محیط کشت سلول‌ها بود. این در حالی است که در غلظت‌های بالاتر از 10^{-7} M درصد سلول‌های زنده کاهش داشت که این امر احتمالا به دلیل غلظت بالا و افزایش سمیت ناشی از سلژلین و متعاقبا مرگ سلول‌ها بود (شکل ۳). بنابراین از غلظت 10^{-7} M به عنوان دوز بهینه برای مراحل بعدی مطالعه استفاده گردید.

نتایج رنگ‌آمیزی کرزیل فست ویوله: رنگ‌آمیزی کرزیل فست ویوله نشان داد که سلول‌های بنیادی عصبی بر خلاف سلول‌های عصبی بالغ، فاقد اجسام نیسل هستند. اجسام نیسل از اجزای سلول‌های نورونی می‌باشند که مجموعه‌هایی گرانولار متشکل از شبکه آندوپلاسمی زبر و ریبوزوم‌ها هستند که وظیفه‌ی پروتئین سازی را بر عهده دارند. این در حالی است که سلول‌های بنیادی عصبی که تحت تیمار با سلژلین قرار گرفته‌اند، نیسل مثبت می‌باشند. نتایج این آزمون نشان داد که سلژلین می‌تواند منجر به بلوغ سلول‌های بنیادی عصبی گردد. البته این بلوغ تا حدی است که سلول‌های بنیادی عصبی ویژگی‌های بنیادینگی خود مثل خودنوسازی را حفظ نموده‌اند. شکل 4C درصد سلول‌های نیسل مثبت در سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با سلژلین (۴۰/۰۱±۴/۷) را در مقایسه با سلول‌های بنیادی عصبی تیمار نشده (۱۱/۵±۱/۰۷) نشان می‌دهد.

نتایج آزمون تانل: نتایج حاصل از آزمون تانل جهت ارزیابی اثر آنتی‌آپوپتوزی سلژلین در سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با هیدروژن پراکساید نشان داد که هیدروژن پراکساید منجر به القای آپوپتوز در سلول‌ها می‌شود. مقایسه‌ی درصد سلول‌های آپوپتوتیک ناشی از هیدروژن پراکساید در گروه NSH (۳۵/۹۸±۱/۶۳) و گروه NH (۶۸/۷۵±۳/۴۲) حاکی از وجود اختلاف معناداری بود که این امر نشان‌دهنده‌ی اثر حفاظتی سلژلین بر روی سلول‌های بنیادی عصبی در برابر آپوپتوز می‌باشد (شکل ۵).

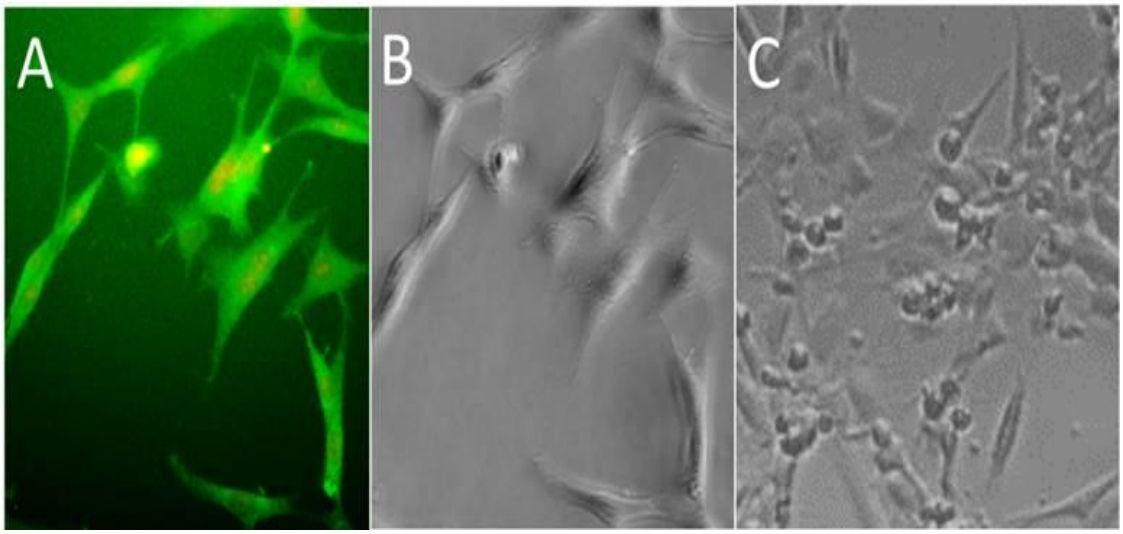


شکل ۱: نوروسفرهای شناور مشتق از سلول‌های بنیادی عصبی در زمان‌های A) ۳ ساعت، B) ۱ روز، C) ۴ روز و D) ۷ روز پس از کشت. E) نمودار مقایسه قطر نوروسفرها در زمان‌های مختلف. * نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با روز هفتم (P<۰/۰۵).

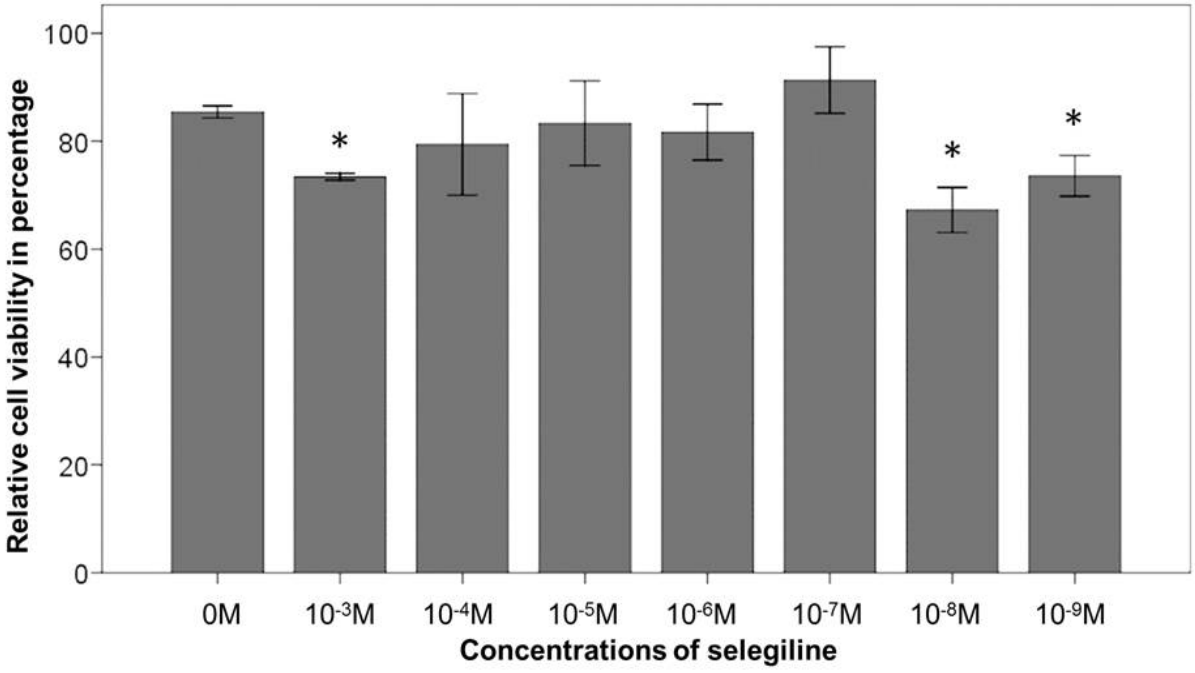
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017



شکل ۲: A و B) ایمنوسیتوشیمی برای نشانگر نستین. تصویر A توسط میکروسکوپ فلورسنت و تصویر B توسط میکروسکوپ فاز کنتراست تهیه شده است. رنگ سبز نشان‌دهنده ی نشانگر نستین و رنگ قرمز نشان‌دهنده ی هسته سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید می‌باشد. C) سلول‌های بنیادی عصبی در پاساژ چهارم. بزرگنمایی ۴۰۰ برابر.

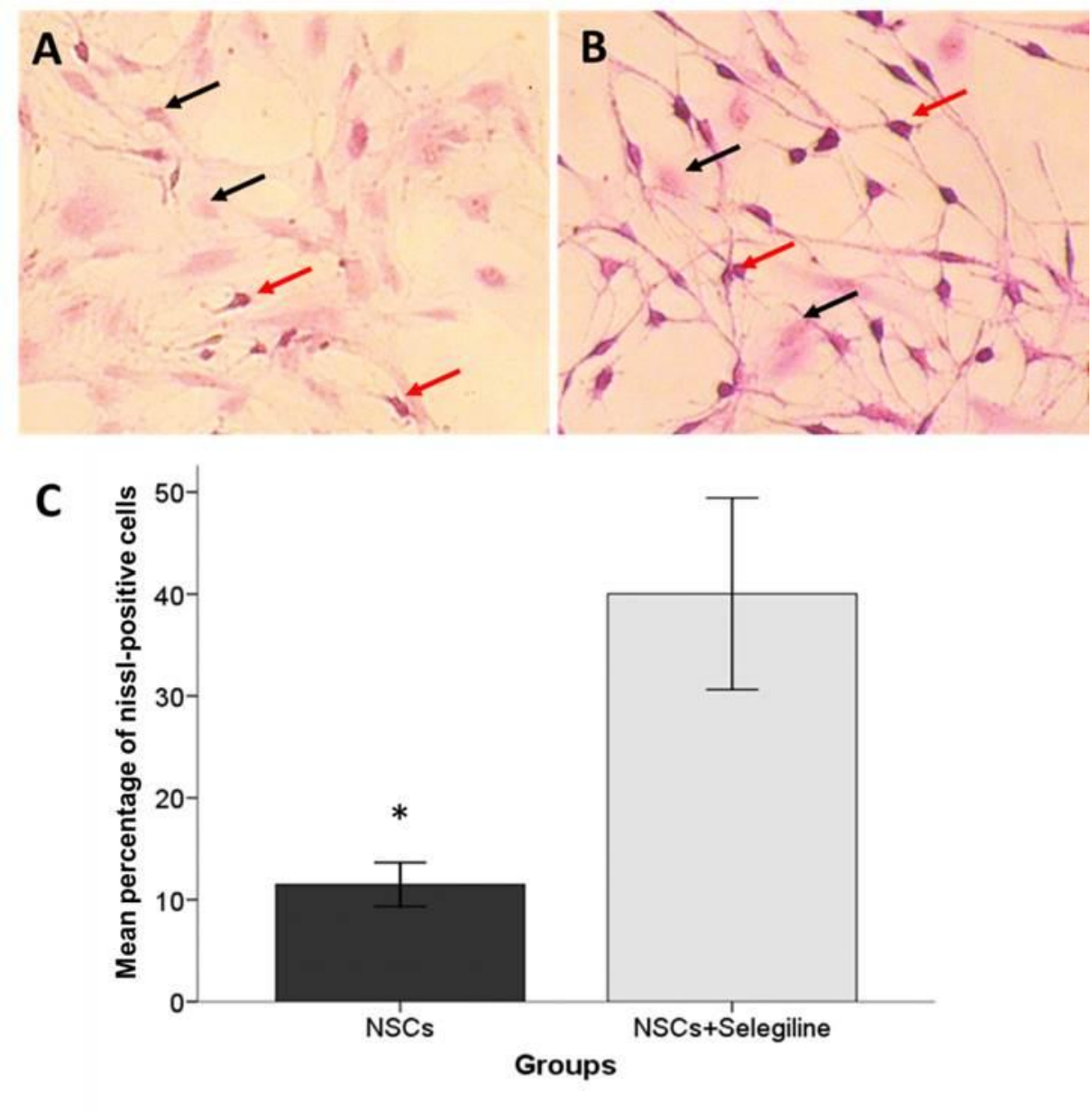


*شکل ۳: نمودار مقایسه سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با غلظت‌های مختلف سلژلین به روش MTT. * نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با غلظت 10^{-7} M (P<۰/۰۵)*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

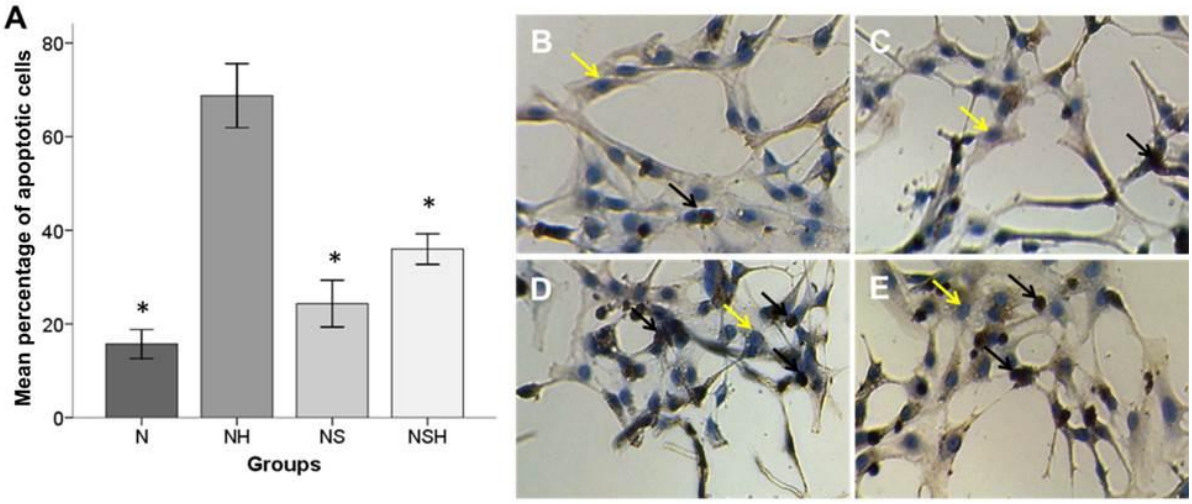


شکل ۴: رنگ‌آمیزی کرزیل فست ویوله در سلول‌های بنیادی عصبی ***A) تیمار نشده و B) تیمار شده با سلژلین. پیکان‌های مشکی نشان‌دهنده سلول‌های نیسل منفی و پیکان‌های قرمز نشان‌دهنده‌ی سلول‌های نیسل مثبت می‌باشند. C) نمودار مقایسه درصد سلول‌های نیسل مثبت در سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با سلژلین و تیمار نشده. * نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه تیمار شده با سلژلین*** 10^{-7} ***M*** ***(P<۰/۰۵).***

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017



شکل ۵: A) نمودار مقایسه درصد سلول‌های تانل مثبت در گروه‌های N (سلول‌های بنیادی عصبی)، NH (سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با هیدروژن پراکساید)، NS (سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با سلژلین) و NSH (سلول‌های بنیادی عصبی پیش‌تیمار شده با سلژلین و تیمار شده با هیدروژن پراکساید). * نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه NH (P<۰/۰۵). B) میکروگراف‌های آزمون تانل مربوط به گروه N. C) میکروگراف‌های آزمون تانل مربوط به گروه NH. D) میکروگراف‌های آزمون تانل مربوط به گروه NS. E) میکروگراف‌های آزمون تانل مربوط به گروه NSH. پیکان‌های مشکی نشان‌دهنده‌ی سلول‌های تانل مثبت و پیکان‌های زرد نشان‌دهنده‌ی سلول‌های تانل منفی می‌باشند.

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سلژلین می‌تواند با حفاظت از سلول‌های بنیادی عصبی در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از هیدروژن پراکساید منجر به کاهش آپوپتوز در این سلول‌ها شود. یکی از ویژگی‌های سلول‌های نورونی حضور اجسام نیسل در این سلول‌ها است. سلول‌های بنیادی عصبی فاقد اجسام نیسل هستند اما تیمار با سلژلین می‌تواند تا حدی باعث بلوغ این سلول‌ها و رویت اجسام نیسل شود.

آسیب اکسیداتیو یکی از عوامل مهم در بروز بیماری‌های تحلیل برنده‌ی عصبی مثل آلزایمر، پارکینسون و هانتینگتون می‌باشد، به طوری که افزایش استرس اکسیداتیو در نهایت باعث آپوپتوز در سلول‌های عصبی می‌شود (۵). از همین رو مهار و تداخل در روند آپوپتوز در سلول‌های عصبی می‌تواند به عنوان رویکردی جهت درمان این بیماری‌ها باشد. در این مطالعه برای اولین بار تاثیر نوروپروتکتیو سلژلین در کاهش آپوپتوز بر روی سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با هیدروژن پراکساید مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل از این مطالعه تاییدی بر آزمایشات پیشین در ارتباط با اثر حفاظتی سلژلین در برابر آپوپتوز می‌باشد. در سال ۱۹۹۶، تاتون و همکارانش برای اولین بار اعلام کردند که سلژلین در غلظت‌های پایین سبب کاهش آپوپتوز در سلول‌های عصبی می‌شود. این گروه نشان دادند که سلژلین در دوزهای پایین روی رشد برخی از سلول‌های عصبی تاثیر گذاشته و از طریق مهار آنزیم مونوآمین اکسیداز B منجر به کاهش رادیکال‌های اکسیداتیو در سلول‌های آسیب دیده و در نتیجه کاهش آپوپتوز می‌گردد (۱۴).

به عقیده‌ی مارویاما و همکارانش، سلژلین با تغییر وقایع داخل سلولی منجر به سرکوب مرگ آپوپتوتیک در سلول‌های عصبی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

می‌شود. این محققین نشان دادند که سلژلین و ترکیب‌های وابسته به آن می‌توانند سرعت مرگ آپوپتوتیک سلول‌ها در دوره‌ی سالمندی را کاهش داده و از بروز بیماری‌های تحلیل برنده‌ی عصبی جلوگیری نماید (۱۵). نتایج حاصل از تحقیقات یونال و همکارانش حاکی از زنده ماندن بیش از ۵۱ درصد از سلول‌های آسیب دیده در انفارکسیون مغزی پس از استفاده از سلژلین می‌باشد (۱۶). این در حالی است که در غلظت‌های بالا، سلژلین و متابولیت‌های آن به دلیل اثرات دوپامینرژیک می‌توانند منجر به القای آپوپتوز شوند. اما استفاده از غلظت‌های پایین با به حداقل رساندن اثرات سوء جانبی می‌تواند باعث کاهش آپوپتوز و مهار تخریب نورون‌ها شود (۱۷). ریوا و همکارانش با بررسی تاثیر سلژلین در بافت عصبی پیشنهاد کردند که اثرات نوروپروتکتیو سلژلین به دلیل افزایش بیان نوروتروفین‌ها است (۱۸). همین امر موجب شد تا مطالعات بسیاری در راستای بررسی اثر نوروپروتکتیو سلژلین انجام پذیرد. نتایج تحقیقات نشان داده که سلژلین حتی در دوزهای اندکی که قادر به مهار مونوآمین اکسیداز B نمی‌باشد نیز اثرات نوروپروتکتیو خود را اعمال نموده و با افزایش بیان نوروتروفین‌هایی همچون GDNF، BDNF، NGF و CNTF باعث رشد و ترمیم سلول‌های عصبی و گلیالی می‌شود. تحقیقات کنتکانن و همکارانش روی نورون‌های دوپامینرژیک نشان داد که سلژلین منجر به القای بیان BDNF در این سلول‌ها می‌شود. در همین راستا میزوتا و همکارانش نیز گزارش کردند که شاهد بیان نوروتروفین‌های BDNF، GDNF و NGF در آستروسیت‌های موشی تیمار شده با سلژلین بودند (۱۹).

امروزه نقش نوروتروفین‌ها به عنوان عوامل حفاظت‌کننده از نورون‌ها در بیماری‌های آلزایمر، پارکینسون، هانتینگتون و ALS به خوبی شناخته شده است. طی پژوهش‌های انجام شده، نقشGDNF در حفاظت از نورون‌ها در مدل‌های سلولی و حیوانی بیماری پارکینسون (۲۰) و BDNF در حمایت از این سلول‌ها در مدل‌های آلزایمر به اثبات رسیده است (۲۱). میزان GDNF در مبتلایان به پارکینسون کاهش قابل توجهی نشان می‌دهد. GDNF با اتصال به گیرنده اختصاصی GFRα1-α4 و فعال نمودن کمپلکس GFRα-Ret باعث فعال شدن مسیرهای پیامدهی پایین دست خود از جمله مسیرهای PI3K/AKT، Ras/ERK، PLC-γ و Src kinase می‌شود (۲۲).

مطالعات نشان داده‌اند که در طی فرایند پیری و همچنین برخی بیماری‌های تحلیل برنده‌ی عصبی میزان بیان BDNF و گیرنده‌های آن شامل TrkB.FL، TrkB.T1 و TrkB.T2 کاهش پیدا می‌کند (۲۳). همان طور که ذکر شد سلژین موجب افزایش بیان BDNF می‌شود، به‌طوری که تجویز سلژلین در بیماران پارکینسون باعث افزایش سطح BDNF در مایع CSF این افراد می‌گردد (۲۴)

سلژلین با حفاظت از سلول‌ها در مقابل استرس اکسیداتیو و نوروتوکسین‌هایی نظیر MPTP از مرگ نورون‌ها جلوگیری می‌کند. در مطالعه‌ای که توسط ژائو و همکارانش در سال ۲۰۱۳ انجام گرفت، این محققان نشان دادند که تیمار با سلژلین در موش‌های آزمایشگاهی مواجه شده با نوروتوکسینی به نام MPTP که منجر به اختلال در عملکرد نورون‌ها و در نهایت آپوپتوز در این سلول‌ها می‌گردد، می‌تواند از طریق افزایش بیان نوروتروفین‌های GDNF و BDNF و همچنین تنظیم بیان ژن‌های خانواده Bcl-2 منجر به مهار آپوپتوز در سلول‌های مغزی شده و بدین ترتیب باعث پیشگیری از تحلیل عصبی و به تاخیر افتادن بروز علائم پارکینسون گردد (۲۵).

مطالعه ی اسماعیلی و همکارانش بر روی سلول‌های عصبی مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی نیز حاکی از افزایش بیان نوروتروفین‌ها تحت تاثیر سلژلین می‌باشد. این محققین توانستند با استفاده از سلژلین، سلول‌های بنیادی جنینی را به سلول‌های شبه‌عصبی تبدیل نمایند. همچنین نتایج حاصل از

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

RT-PCR نشان داد که سلول‌های عصبی ایجاد شده قادر به بیان برخی از نوروتروفین‌ها می‌باشند. ایشان با استفاده از رنگ‌آمیزی کرزیل فست ویوله ثابت کردند که سلول‌هایی که دارای فنوتیپ عصبی هستند دارای اجسام نیسل می‌باشند (۲۶). قربانیان و همکارانش در سال ۲۰۱۰ با استفاده از سلژلین، سلول‌های بنیادی مغز استخوان را به سلول‌های شبه عصبی تبدیل کردند. این محققین در مطالعات خود به این نتیجه رسیدند که سلول‌های استرومایی مغز استخوان تحت القاء سلژلین علی‌رغم بیان مارکرهای عصبی مثل نستین، سیناپسین و MAP-2 قادر به بیان نوروتروفین‌های BDNF, NGF و NT-3 نیز می‌باشند (۲۷). دکتر عبدانی پور و همکارانش در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی پس از تیمار با سلژلین به سلول‌های شبه موتونورون تمایز می‌یابند. سلول‌های حاصل از تمایز می‌توانند برای سلول درمانی در بیماری‌های تحلیل برنده عصبی و آسیب‌های وارد شده به بافت‌های عصبی مورد استفاده قرار گیرند (۲۸). در همین راستا دکتر عبدانی‌پور و همکارانش در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۴ با پیوند موتونورون‌های ایجاد شده در مطالعه قبل به موش‌های ضایعه نخاعی مدل کانتیوژن شاهد بهبود وضعیت حرکتی و رفتاری در این موش‌ها بودند (۲۹). مطالعه‌ی حسن‌زاده و همکارانش در سال ۲۰۱۵ نشان داد که تیمار سلول‌های بنیادی عصبی با غلظت 10^{-7} و 10^{-8} مولار از سلژلین به مدت ۲۴ ساعت، با افزایش بیان BDNF، NGF و NT3 و نهایتا تمایز به سلول‌های نورونی همراه خواهد بود (۳۰).

نوروتروفین‌ها باعث فعال شدن رسپتورهای تیروزین کینازی خانواده‌ی کینازهای مرتبط با تروپومیزین (Trk) مثل TrkA، TrkB و TrkC و همچنین گیرنده‌ی نوروتروفین p57(p57NTR) می‌شوند. حشمتی و همکارانش در سال ۲۰۱۳، با ایجاد ضایعه‌ی نخاعی در رت‌های بالغ تیمار شده با سلژلین، اثر نوروپروتکتیو این دارو را مورد بررسی قرار دادند. بدین ترتیب که پس از ایجاد ضایعه، میزان رونوشت ژن‌های p75NTR، TrkA و TrkB را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که سلژلین با مهار بیان p75NTR و افزایش بیان رسپتور TrkB اثرات حفاظتی خود را به انجام می‌رساند. لازم به ذکر است که نوروتروفین‌ها از طریق p57NTR باعث فعال شدن NF-κB و Jun kinase شده و متعاقبا منجر به افزایش بقای وابسته به NF-κB در نورون‌ها می‌گردد (۳۱).

سلژلین به‌طور مستقیم با مهار مسیر میتوکندریای از مرگ سلول‌ها جلوگیری می‌کند. اعضای خانواده Bcl-2 با استقرار در غشای داخلی میتوکندری باعث تنظیم منافذ عبوری نفوذپذیری میتوکندری و کانال القایی آپوپتوز در غشای خارجی می‌شود. از این رو Bcl-2 نقش بسزایی در حفظ عملکرد میتوکندری و تنظیم مسیر داخلی آپوپتوز دارد (۳۲). مطالعات اخیر نشان داده که سلژلین با تغییر در نفوذپذیری میتوکندری باعث مهار انتشار کلسیم از این اندامک می‌شود. انتشار کلسیم از میتوکندری محرک اولیه برای آغاز آبشار آپوپتوز می‌باشد. از این رو، مهار آن می‌تواند منجر به مهار آپوپتوز در سلول‌ها گردد (۳۳). تیمار سلول‌های رده نوروبلاستومای انسانی (SH-SY5Y) با سلژلین می‌تواند باعث افزایش بیان Bcl-2 در سطح mRNA و پروتئین گردد (۳۴). سلژلین با افزایش تجمع Nrf2 در هسته، باعث افزایش رونویسی از عوامل آنتی‌اکسیدان نظیر آنزیم هم اکسیژناز در این رده سلولی می‌شود. بدین منظور سلژلین از طریق گیرنده‌های Trk، به خصوص گیرنده‌ی TrkB به صورت مستقیم یا غیر مستقیم منجر به فسفریله و فعال شدن PI3K می‌شود. سپس PI3K منجر به انتقال Nrf2 از سیتوپلاسم به هسته و رونویسی از ژن‌های هدف می‌گردد (۳۵).

علی‌رغم سلول‌های عصبی، تاثیر سلژلین بر روی سایر سلول‌ها و بیماری‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفته است. تجویز سلژلین در ناراحتی‌های قلبی مزمن با کاهش سطح پلاسمایی نوراپی نفرین، کاهش آسیب اکسیداتیو و در نهایت کاهش

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

میزان آپوپتوز در میوسیت‌های قلب، در بهبود آسیب‌ها موثر بوده است (۳۶). حتی در زمینه‌ی تولید مثل و باروری نیز سلژلین مورد توجه محققان قرار گرفته است. تحقیقات انجام شده توسط میهالیک و همکارانش در سال ۲۰۱۵ نشان داد که تجویز سلژلین می‌تواند منجر به افزایش تعداد اسپرم‌ها، افزایش سطح سرمی تستوسترون، FSH و آنتی‌اکسیدان‌ها و همچنین افزایش تعداد زاده‌ها در موش‌های صحرایی شود (۳۷). به‌طور کلی سلژلین از طریق مسیرهای مختلفی مثل مهار آنزیم مونوآمین اکسیداز B، مهار تولید رادیکال‌های آزاد، افزایش بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl2، افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مثل سوپراکساید دیسموتاز و کاتالاز، تداخل در مسیرهای آپوپتوز، افزایش بیان فاکتورهای رشد عصبی و تغییر الگوی بیان عواملی همچون GAPDH و سایر مولکول‌های اکسیداسیون-احیا مثل تیوردوکسین اثرات خود را اعمال می‌کند (۳۸).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از سلژلین با غلظت $۱۰^{-۷}$ مولار در شرایط In Vitro منجر به افزایش بقای سلول‌های بنیادی عصبی می‌گردد. همچنین اثرات نوروپروتکتیو این دارو در غلظت $۱۰^{-۷}$ مولار موجب حمایت سلول‌های بنیادی عصبی و کاهش میزان آپوپتوز در شرایط آسیب اکسیداتیو می‌شود. از همین رو می‌توان از سلژلین به عنوان کاندیدی مناسب در راستای ترمیم ضایعات و بهبود بیماری‌های سیستم عصبی بهره برد. علاوه بر این، افزایش کیفیت کشت سلول‌های بنیادی عصبی در راستای مقاصد درمانی مثل سلول‌درمانی را می‌توان به عنوان یکی دیگر از کاربردهای احتمالی سلژلین به حساب آورد، هرچند این موضوع نیازمند مطالعات تکمیلی بیشتر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه ی کارشناسی ارشد به شماره طرح ZUMS.REC.1394.120 مصوب در دانشگاه علوم پزشکی زنجان می‌باشد و با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه و در آزمایشگاه تحقیقات فناوری نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زنجان انجام شده است. نویسندگان مقاله از حمایت سرکار خانم دکتر تینا شاهانی و جناب آقای دکتر مهرداد پدرام که در انجام این تحقیق نهایت همکاری و راهنمایی را داشتند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1- Kim Y, Kim DJ, Hwang O, Kim Y. Pathology of neurodegenerative diseases: INTECH Open Access Publisher; 2012.

2- Sheikh S, Haque E, Mir SS. Neurodegenerative diseases: multifactorial conformational diseases and their therapeutic interventions. *J Neurodegenerative Dis.* 2012; 2013.

3- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Clin Biochem.* 2015; 30: 11-26.

4- Benkler C, Barhum Y, Ben-Zur T, Offen D. Multifactorial gene therapy enhancing the glutamate uptake system and reducing oxidative stress delays symptom onset and prolongs survival in the SOD1-G93A ALS mouse model. *J Molec Neuro Sci.* 2016; 58: 46-58.

5- Harrison JF, Hollensworth SB, Spitz DR, Copeland WC, Wilson GL, LeDoux SP. Oxidative

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance. *Nuc acid Res.* 2005; 33: 4660-71.

6- Gage FH, Temple S .Neural stem cells: generating and regenerating the brain. *Neuron.* 2013; 80: 588-601.

7- Knoll J. History of deprenyl--the first selective inhibitor of monoamine oxidase type B. *Vopr Med Khim.* 1996; 43: 482-93.

8- Nagatsu T, Sawada M. Molecular mechanism of the relation of monoamine oxidase B and its inhibitors to parkinson's disease: possible implications of glial cells. Oxidative Stress and Neuroprotection: Springer; 2006. p. 53-65.

9- Laks DR, Masterman ‐ Smith M, Visnyei K, et al. Neurosphere formation is an independent predictor of clinical outcome in malignant glioma. *Stem Cells.* 2009; 27: 980-7.

10- Yang Q, Mu J, Li Q, et al. A simple and efficient method for deriving neurospheres from bone marrow stromal cells. *Biochem Biophysical Res Communicate.* 2008; 372: 520-4.

11- Mytilineou C, Leonardi EK, Radcliffe P, et al. Deprenyl and desmethylselegiline protect mesencephalic neurons from toxicity induced by glutathione depletion. *J Pharmacol Exper Therap.* 1998; 284: 700-6.

12- Kong P, Zhang B, Lei P, et al. Neuroprotection of MAO-B inhibitor and dopamine agonist in Parkinson disease. Int J Clin Expe Medicine. 2015; 8: 431-9.

13- Abdanipour A, Tiraihi T, Noori-Zadeh A, Majdi A, Gosaili R. Evaluation of lovastatin effects on expression of anti-apoptotic Nrf2 and PGC-1alpha genes in neural stem cells treated with hydrogen peroxide. *Molec Neurobiol.* 2014; 49: 1364-72.

14- Tatton W, Wadia J, Ju W, Chalmers-Redman R, Tatton N. Deprenyl reduces neuronal apoptosis and facilitates neuronal outgrowth by altering protein synthesis without inhibiting monoamine oxidase: Springer; 1996.

15- Maruyama W, Naoi M. Neuroprotection by deprenyl and related compounds. Mechanism Age Develop. 1999; 111: 189-200.

16- Ünal I, Gürsoy-Özdemir Y, Bolay H, Söylemezolu F, Sarıbaş O, Dalkara T. Chronic daily administration of selegiline and EGb 761 increases brain's resistance to ischemia in mice. *Brain Res.* 2001; 917: 174-81.

17- Magyar K, Szende B. Deprenyl, a selective MAO-B inhibitor, with apoptotic and anti-apoptotic properties. *Neurotoxicol.* 2004; 25: 233-42.

18- Riva MA, Molteni R, Racagni G. L ‐ Deprenyl potentiates cAMP ‐ induced elevation of FGF ‐ 2 mRNA levels in rat cortical astrocytes. *Neuroreport.* 1997; 8: 2165-8.

19- Mizuta I, Ohta M, Ohta K, et al. Selegiline and desmethylselegiline stimulate NGF, BDNF, and GDNF synthesis in cultured mouse astrocytes. *Biochem Biophysic Res Communicate.* 2000; 279: 751-5.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

20- Cohen AD, Zigmond MJ, Smith AD. Effects of intrastriatal GDNF on the response of dopamine neurons to 6-hydroxydopamine: time course of protection and neurorestoration. *Brain Res.* 2011; 1370: 80-8.

21- Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of alzheimer's disease. *Nature Med.* 2009; 15: 331-7.

22- Mograbi B, Bocciardi R, Bourget I, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activities exert opposing effects on the ERK pathway: importance for the rescue of neuroectodermic cells. *J Biol Chem*. 2001; 276: 45307-19.

23- Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S. New insights into brain BDNF function in normal aging and alzheimer disease. Brain Res Rev. 2008; 59: 201-20.

24- Maruyama W, Naoi M. ‘‘70th Birthday Professor Riederer’’Induction of glial cell line-derived and brain-derived neurotrophic factors by rasagiline and (−) deprenyl: a way to a disease-modifying therapy? J Neural Transm. 2013; 120: 83-9.

25- Zhao Q, Cai D, Bai Y. Selegiline rescues gait deficits and the loss of dopaminergic neurons in a subacute MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Int J Molec Med.* 2013; 32: 883-91.

26- Esmaeili F, Tiraihi T, Movahedin M, Mowla SJ. Selegiline induces neuronal phenotype and neurotrophins expression in embryonic stem cells. *Rejuvenation Research.* 2006; 9: 475-84.

27- Ghorbanian MT, Tiraihi T, Mesbah-Namin SA, Fathollahi Y. Selegiline is an efficient and potent inducer for bone marrow stromal cell differentiation into neuronal phenotype. *Neurological Res.* 2010; 32: 185-93.

28- Abdanipour A, Tiraihi T, Delshad A. Trans-differentiation of the adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells expressing neurotrophins by selegiline. *Iran Biomed J.* 2011; 15: 113-21.

29- Abdanipour A, Tiraihi T, Taheri T. Intraspinal transplantation of motoneuron-like cell combined with delivery of polymer-based glial cell line-derived neurotrophic factor for repair of spinal cord contusion injury. *Neural Regener Res.* 2014; 9: 1003.

30- Hassanzadeh K, Nikzaban M, Moloudi MR, Izadpanah E. Effect of selegiline on neural stem cells differentiation: a possible role for neurotrophic factors. *Iran J Basic Med Sci.* 2015; 18: 549.

31- Heshmati M, Delshad AA. Changes in gene expression of P75 and Trk receptors in deprenyl-treated spinal cord injury rats. *World Apply Sci J.* 2013; 22: 771-8.

32- Toman J, Fiskum G. Influence of aging on membrane permeability transition in brain mitochondria. *J Bioenerg Biomem.* 2011;43: 3-10.

33- Wu Y, Kazumura K, Maruyama W, Osawa T, Naoi M. Rasagiline and selegiline suppress

www.SID.ir

Archive of SID

calcium efflux from mitochondria by PK11195-induced opening of mitochondrial permeability transition pore: a novel anti-apoptotic function for neuroprotection. *J Neural Trans.* 2015; 122: 1399-407.

34- Inaba-Hasegawa K, Akao Y, Maruyama W, Naoi M. Type A monoamine oxidase is associated with induction of neuroprotective Bcl-2 by rasagiline, an inhibitor of type B monoamine oxidase. *J Neural Transm.* 2012; 119: 405-14.

35- Xiao H, Lv F, Xu W, Zhang L, Jing P, Cao X. Deprenyl prevents MPP+-induced oxidative damage in PC12 cells by the upregulation of Nrf2-mediated NQO1 expression through the activation of PI3K/Akt and Erk. *Toxicol.* 2011; 290: 286-94.

36- Qin F, Shite J, Mao W, Liang C-s. Selegiline attenuates cardiac oxidative stress and apoptosis in heart failure: association with improvement of cardiac function. *Europ J Pharmacol.* 2003; 461: 149-58.

37- Mihalik J, Mašlanková J, Solár P, et al. The effect of R-(-)-deprenyl administration on reproductive parameters of rat males. *Europe J Pharmacol.* 2015; 754: 148-52.

38- Bar-Am O, Amit T, Youdim MB, Weinreb O. Neuroprotective and neurorestorative potential of propargylamine derivatives in ageing: focus on mitochondrial targets. *J Neural Transm.* 2016; 123: 125-35.

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Anti-Apoptotic Effect of Selegiline as Monoamine Oxidase Inhibitor on Rat Hippocampus Derived Neural Stem Cells in Oxidative Stress Condition

Nikfar A[1], Abdanipour AR[2], Gholinejad M[3]

[1]Dept. of Genetics and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

[2]Dept. of Anatomy, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

[3]Dept. of Medical Biotechnology and Nanotechnology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

Corresponding Author: Abdanipour AR, Dept. of Anatomy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

E-mail: abdani.anatomy@yahoo.com

Received: 9 Aug 2016 **Accepted:** 16 Jan 2017

Background and Objective: Damaged and inflammatory cells in the nervous system produce reactive oxygen species (ROS). The overproduction of ROS can cause serious damage to important biomolecules and over activation of programmed cell death leads to many progressive neurodegenerative disorders. The aim of this study was to evaluate the effects of selegiline on inhibition of apoptosis in oxidative damage induced by hydrogen peroxide in rat hippocampus derived neural stem cells.

Materials and Methods: The neural stem cells were isolated from the hippocampi of neonatal rats then pretreated with different doses of selegiline for 48 hours while later being exposed to 125μM H2O2 for 30 min. Using MTT assay and TUNEL staining, we evaluated the effects of selegiline on cell survival and apoptosis in pretreated NSCs compared to control groups. Also, the induction of NSCs to neuron-like cells was evaluated using Nissl staining.

Results: The results showed that apoptosis rate was significantly decreased in 10^{-7} M of selegiline pretreated NSCs compared to the control group. Also, the mean percentage of Nissl positive cells significantly increased in selegiline pretreated neural stem cells compared to the control group.

Conclusion: Our findings suggest that selegiline protects NSCs against oxidative stress induced cell death, and therefore, it may be used to promote the survival rate of NSCs and can be a candidate for treatment of oxidative stress-mediated neurological diseases.

Keywords: Neural stem cells, Selegiline, Oxidative stress, Apoptosis

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir